FUJIFILM Life Science

ハンドブック

RNA組織キット（スピン法）

QuickGene SP kit RNA tissue (SP-RT)

Ver.1

Contents

1. はじめに …… 3
2. キット内容物と保存条件 …… 3
   2-1 キット内容物 …… 3
   2-2 保存条件 …… 3
3. キット以外にご準備いただくもの …… 4
4. 取り扱い上の安全注意事項 …… 4
5. 使用上の注意事項 …… 5
6. 品質管理 …… 7
7. 製品説明 …… 7
8. プロトコール …… 8
   8-1 試薬の準備 …… 8
   8-2 抽出フローおよびプロトコール詳細 …… 9
9. トラブルシューティング …… 21
10. オーダリング・インフォメーション …… 26

付録1 QuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）データ例 …… 27

ご注意 本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

このキットをご利用いただくことにより、簡便に動物組織（5 ～ 30mg）からtotal RNAを抽出することができます。
このキットの特徴は以下のとおりです。

- ライセート調製から約30分で抽出操作が完了します（8サンプルを処理した場合）。
- フェノールやクロロホルムなど有害な有機溶剤が不要です。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まず、高純度のtotal RNAが得られます。

このキットをご使用になる際は、本ハンドブックをよくお読みください。

2. キット内容物と保存条件

2-1 キット内容物

以下の内容物が入っていますのでご確認ください。
キットには96処理分のtotal RNA抽出ができる試薬が含まれています。

□ Lysis Buffer	LRT	85ml
□ Solubilization Buffer	SRT	40ml
□ Wash Buffer	WRT	75ml
□ Elution Buffer	CRT	100ml
□ Cartridges（カートリッジ）	CAS	96個
□ Waste Tubes（廃液容器）	WTS	192個

2-2 保存条件

指定の温度（15 ～ 28℃）で保存してください。試薬は指定の温度で保存する場合、購入後9カ月間安定です。

3. キット以外にご準備いただくもの

①試薬
- 2-メルカプトエタノール（2-ME）（LRTに添加して使用）
- 特級エタノール（>99%）（ライセート調製時およびWRTの調製に使用）

②器具・機材
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（RNaseフリーのもの）
- 1.5mlマイクロチューブ（RNaseフリーのもの、前処理および核酸溶出時に使用）
- チューブスタンド
- チューブミキサー（2,500rpm程度の攪拌ができるもの）
- ボールミル型ホモジナイザー
  （トミー精工製MicroSmash MS-100、またはキアゲン製TissueLyser）
- ホモジナイザーに対応したチューブ
  ボールミル型ホモジナイザーの場合
  トミー精工製MicroSmash MS-100用：トミーメディコ2mlチューブ
  （Cat. No.72693）
  ※滅菌済チューブは強度が弱いので避けてください。
  キアゲン製TissueLyser用：TreffLab製2.0mlクリックキャップ
  （Cat. No.96.9329.9.01）
- ボール（ジルコニア5mmφ）
- マイクロ遠心機（17,000×g（15,000rpm）以上の遠心が可能なもの）（*）
  （*）遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、ご使用ください。

※必要に応じて用意していただくもの
- DNase

[推奨品]

・RQ1 RNase-Free DNase	（Promega：Cat. No. M6101）
・Deoxyribonuclease（RT Grade）	（ニッポンジーン：Cat. No. 313-03161）
・DNase Ⅰ, RNase-Free	（Ambion：Cat. No. 2222）
・RNase-Free DNase Set	（QIAGEN：Cat. No. 79254）

4. 取り扱い上の安全注意事項

◆ LRT（Lysis Buffer）

薬品の特性　：● 飲むと有害の可能性があります。

取り扱い上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。
- この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ SRT（Solubilization Buffer）

取り扱い上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ WRT（Wash Buffer）

取り扱い上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ CRT（Elution Buffer）

取り扱い上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ LRTは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRTを含む溶液やライセートフロースルーは、漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので関連する法に従い、焼却、溶融、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分業の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票（マニフェスト）を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

性状および取り扱いに関する詳細情報はMSDS（製品安全データシート）をご参照ください。MSDSは弊社ホームページ（http://lifescience.fujifilm.com/）からも引き出せます。

5. 使用上の注意事項

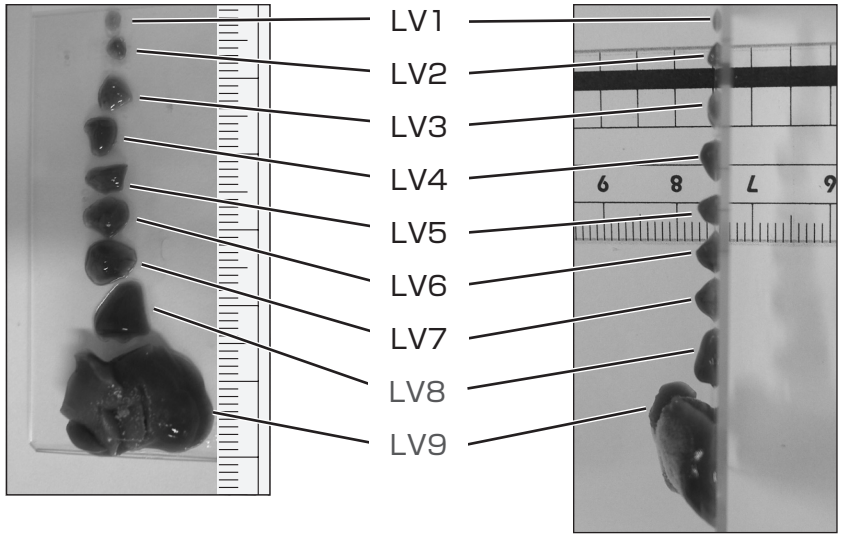
〈キット使用について〉
- キットは室温（15 ～ 28℃）でご使用ください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- LRTは保存中に析出物を生じることがあります。その場合、37℃で溶解後、室温に戻してからご使用ください。
- 組織サンプルをホモジナイズする前に、表1（p.7）を参考に、サンプル処理量を必ずご確認ください。
- 表1（p.7）に示した処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ（CAS）が目詰まりを起こす可能性があります。
- 30mg以下の組織でも、組織部位、状態、ホモジナイズ条件によっては目詰まりを起こす可能性があります。
- 本キットで初めて抽出されるサンプルの場合は、組織量10mgから抽出をスタートし、予備実験を行ってください。
- 組織重量を確認し、重量に応じたプロトコールを用いて抽出を行ってください。
  （15 ～ 30mg：p.10、5 ～ 15mg：p.16）

● 図１にマウス正常組織（肝臓）の重量とサイズの対応例を実寸大で示します。組織重量の参考にしてください。

図1：マウス正常組織（肝臓）の重量とサイズの対応例
Balb/cマウス（メス、7週齢）正常組織での例です。

肝臓

No.	実測値	長軸	短軸	高さ	
LV1	2.3mg	1.5mm	1.5mm	0.5mm	処理可能範囲
LV2	5.0mg	2.0mm	2.0mm	1.0mm	
LV3	11.6mg	4.0mm	4.0mm	1.0mm	
LV4	16.2mg	5.0mm	4.0mm	2.0mm	
LV5	21.7mg	5.0mm	3.5mm	2.5mm	
LV6	25.6mg	6.0mm	5.0mm	2.5mm	
LV7	30.7mg	7.0mm	5.0mm	2.5mm	
LV8	56.7mg	8.0mm	7.0mm	2.5mm	適用外
LV9	850.2mg	20.0mm	14.0mm	8.0mm	



※LV2 ～ LV7が5～ 30mgに対応しています。

● 遠心する際はカートリッジ（CAS）の蓋をしっかりと閉めてください。
● カートリッジ（CAS）を廃液容器（WTS）にセットするときは、しっかりと押し込んでください。
● 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。抽出性能に悪影響を及ぼすことがあります。
● 遠心を行う際は、指定された条件（回転数、時間など）を守ってご使用ください。
● LRTは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。
● LRTを含む溶液やライセートフロースルーは、漂白剤と混合しないでください。

〈RNaseのコンタミネーション防止について〉
● RNaseのコンタミネーションを防ぐため、RNAや抽出用試薬を取り扱うときは、使い捨て手袋を着用してください。
● できるだけ使い捨ての滅菌したプラスチック製品をご使用ください。これらは一般的にRNaseフリーのため、RNaseを不活化するための処理を必要としません。
● ガラスや金属製品を使う場合は200℃にて16時間以上、乾熱滅菌した後、ご使用ください。

6. 品質管理

QuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）には、RNaseのコンタミネーションがないことを確認しています。

7. 製品説明

QuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）は基本的に動物組織5 ～ 30mgからのtotal RNA抽出・精製に対応しています。

表1 マウス正常組織　処理可能組織量
Balb/cマウス（メス、7週齢）正常組織での例です。

組織部位	処理可能組織量
肝臓	30mg
脾臓	30mg
心臓	30mg※

※ 心臓など一部組織の場合は、他の組織と比べてホモジナイズ条件をさらに強くする必要があります。表3（p.12）を参考に、ホモジナイズ条件をご検討ください。

- 処理可能組織量は、組織の状態、部位などにより変動します。組織部位、状態、ホモジナイズ条件によっては処理可能組織量が30mg未満となることもあります。
- 動物から採取した新鮮な組織、または凍結保存組織（−80℃）を使用します。組織を凍結保存する際は、液体窒素で急速に凍結させ、直ちに−80℃にて保管してください。

マウス正常組織よりQuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）を用いて抽出した際のtotal RNA収量・純度例は表2のとおりです。

表2 total RNAの収量・純度例（Balb/cマウス（メス、7週齢）正常組織）
（トミー精工製MicroSmash MS-100にてホモジナイズ、DNase処理あり）

組織部位	組織量	収量例	260/280比
肝臓	30mg	100～120μg	2.2
脾臓	30mg	40～50μg	2.2
心臓	30mg	15～20μg	2.3

- 収量・純度は組織の状態、部位などにより変動します。

8. プロトコール

8-1 試薬の準備

◆LRT（85ml）
使用前に充分に混和してください。
析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してからお使いください。
使用前にその都度必要量分注し、LRT1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加してください。その際は適切な保護具を着用し、ドラフト内で調整してください。

◆SRT（40ml）
使用前に充分に混和してください。

◆WRT（75ml）
濃縮状態でお届けします。
使用前に、ボトルに175mlの特級エタノール（>99%）を添加し、よく混和してください。
エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。エタノール添加後は揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

◆CRT（100ml）
核酸溶出時には必ずCRTを使用してください。

◆DNase溶液（DNase処理をする場合）
プロトコール詳細（p.14<9>またはp.19<9>）を参照して調製してください。
調製後はただちにご使用ください。

8-2 抽出フローおよびプロトコール詳細

QuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）は基本的に動物組織5～30mgからのtotal RNA抽出・精製に対応しています。

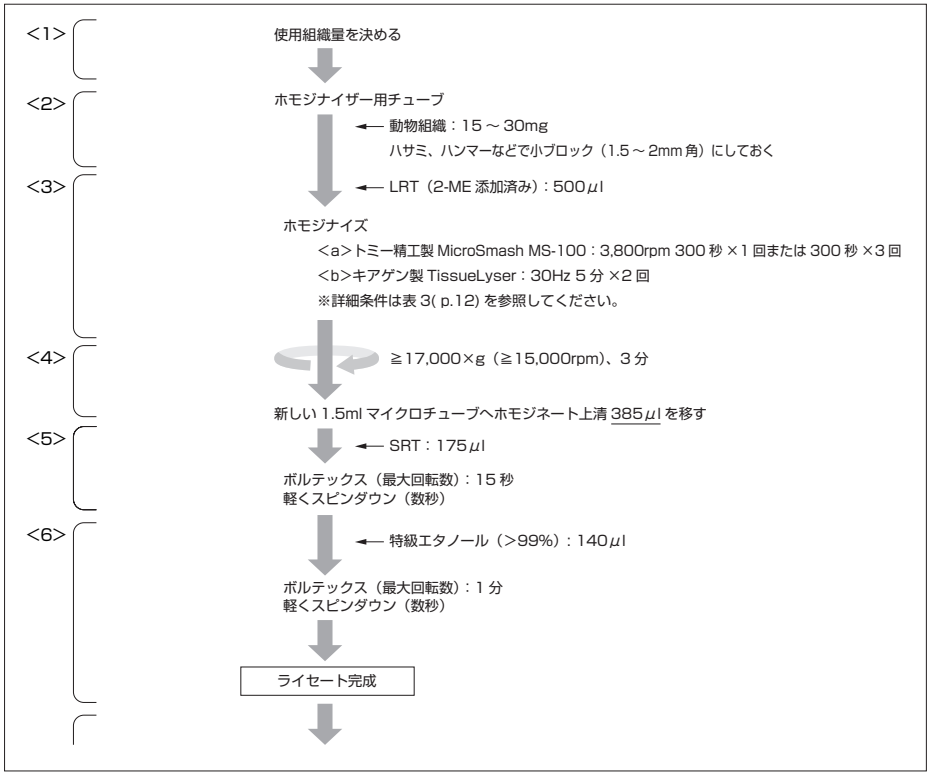
【実験を始める前の重要事項】
- 本キットで初めて抽出されるサンプルの場合は、組織量10mgから抽出をスタートし、予備実験を行ってください。
- 組織サンプルをホモジナイズする前に、表1（p.7）を参考に、サンプル処理量を必ずご確認ください。図1（p.6）のマウス正常組織（肝臓）の重量とサイズの対応例も参考にしてください。組織重量を確認し、重量に応じたプロトコールを用いて抽出を行ってください。
（15～30mg：p.10、5～15mg：p.16）
- 表1（p.7）に示した処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ（CAS）が目詰まりを起こす可能性があります。
- 動物から採取した新鮮な組織、または凍結保存組織（−80℃）を使用します。組織を凍結保存する際は、液体窒素で急速に凍結させ、直ちに−80℃にて保管してください。
- 凍結組織を使用する場合は、組織が融けないうちに速やかに所定量をはかりとってください。
- 凍結組織を室温に放置したり、一度融けたものは使用しないでください。
- 組織にLRTを添加後、速やかにホモジナイズ工程に進めてください。
- 心臓など一部組織の場合は、他の組織と比べてホモジナイズ条件をさらに強くする必要があります。表4（p.18）を参考に、ホモジナイズ条件をご検討ください。
- 試薬の液量は抽出フロー（p.10、16）に記載された量を厳守してください。
- カートリッジ（CAS）内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- クロスコンタミネーションを防ぐため、溶液を扱う際は毎回ピペットチップを交換することをおすすめします。
- 遠心を行う際は、指定された条件（回転数、時間など）を守ってご使用ください。
- 遠心機内の温度が上昇をするのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。抽出性能に悪影響を及ぼすことがあります。
- すべての操作は室温（15～28℃）で行ってください。
- 抽出の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- LRTを含む溶液やライセートフロースルーは、漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。
- 遠心後、遠心機からカートリッジ（CAS）と廃液容器（WTS）を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は、軽くスピンダウン（数秒）を行ってください。

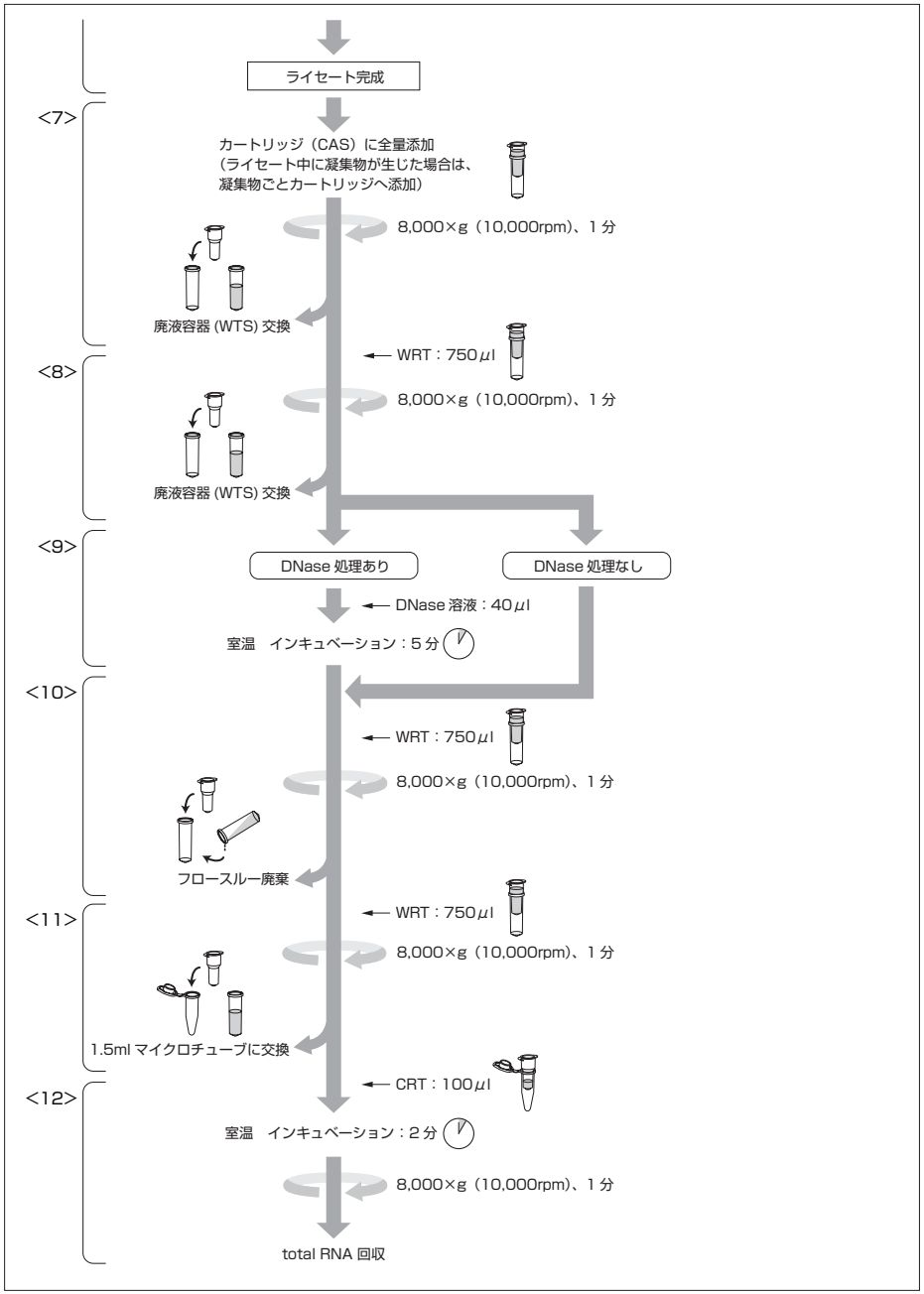
使用する組織量によってプロトコールが異なりますので、組織量をご確認の上対応するプロトコールを適用してください。

15～30mg：p.10
5～15mg：p.16

組織量15～30mg：抽出フロー

- LRT使用前に、LRT1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加してください。
- WRTに175mlの特級エタノール（>99%）が添加されていることをご確認ください。
- DNaseを使用する場合はp.4を参照の上、ご用意ください。DNase溶液調製法はp.14に記載されています。





プロトコール15～30mg

組織量15 ～ 30mg：プロトコール詳細

<1> 動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。
使用する動物組織重量を決めてください。

表1（p.7）を参考に、スタート組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下する可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らしてご検討ください。表1（p.7）に載っていない組織種の場合は、スタート組織量を10mgとし、組織量5 ～ 15mgのプロトコール（p.16）に従って処理を行ってください。

<2> 組織をハサミ、ハンマーなどで1.5 ～ 2mm角の小ブロックにし、動物組織重量を測定します。各ボールミル型ホモジナイザーに対応したチューブ（p.4参照）にあらかじめ5mmφジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時にはRNAの分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT（2-ME添加済み）を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3> LRT（2-ME添加済み）を500μl添加し、ボールミル型ホモジナイザー添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。
回転数や処理時間は、組織の種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は表3のとおりです。3.（p.4）を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

凍結したチューブにLRTを添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないようにご注意ください。

表3 組織量15 ～ 30mgの場合のボールミルホモジナイズ条件例

	<a>トミー精工製 MicroSmash MS-100	<b>キアゲン製 TissueLyser
肝臓・脾臓	3,800rpm 300秒	30Hz 5分×2回
心臓	3,800rpm 300秒×3回	

下記の場合はホモジナイズチューブが破損することがありますので、指定の条件を守ってお使いください。

- 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- プロトコールに記載の液量とは異なる液量でホモジナイズを行う場合
- 5mmφジルコニアボール以外のボールを使用する場合

<4> 組織破片を分離除去するため、≧17,000×g（≧15,000rpm）で3分、室温にて遠心します。
底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清385μlを新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。
やむ得ず放置される場合、1時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5> SRTを175μl添加し、最大回転数にてボルテックスを15秒間行います。数秒間スピンダウンして、キャップや壁についた液を収集します。

<3> ～ <4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート：SRT：エタノール＝11：5：4」に調節してください。

<6> 特級エタノール（>99%）を140μl添加し、最大回転数にてボルテックスを1分間行ってください。数秒間スピンダウンして、キャップや壁についた液を収集します（ライセート完成）。ライセート完成後は、速やかに抽出操作へ進めてください。

このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

<7> ライセートを数回ピペッティングし、注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、カートリッジ に全量添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器（WTS、キット同梱）にカートリッジをセットし、フロースルー（ろ液）と廃液容器を捨てます。

試料によっては、凝集物ができることがありますが、すべての凝集物ごとカートリッジへ添加します。遠心後ライセートがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<8> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器（WTS､キット同梱）にカートリッジをセットし、フロースルーと廃液容器を捨てます。

遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<9> DNaseを使用する場合は、チューブラックなどに立てDNase処理へ進めます。
（DNaseを使用しない場合は、<10>に進んでください。）
DNaseは推奨品（p.4参照）をご準備ください。

<9-1> 各社推奨DNase溶液調製

製品名	メーカー名	Cat.No.	調製方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40μl
Deoxyribonuclease（RT Grade）	ニッポンジーン	313-03161		
DNase Ⅰ, RNase-Free	Ambion	2222	2	40U/40μl
RNase-Free DNase Set※1	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40μl

※1：1,500Kunitz unitsの入ったボトルに添付のRNaseフリー水を550μl 添加後、DNaseストック溶液を調製してください（DNase添付の取扱説明書も参照してください）。

調製方法1）

1U/μl DNase Ⅰ	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法2）

2U/μl DNase Ⅰ	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法3）

2.7Kunitz units/μl DNase Ⅰ※2	1.25μl
Buffer RDD	35μl
ヌクレアーゼフリー水	3.75μl

※2：QIAGEN社プロトコールどおりにDNase溶液を調製すると、DNase活性が過剰となる可能性があります。上記条件でのDNase溶液調製をおすすめします。

<9-2> DNaseオンカラム処理方法

いずれのDNaseの場合も、カートリッジ（CAS）1本あたりフィルター上に40μl添加します。添加後、室温で5分間カートリッジ上にてインキュベートします。

DNase溶液の添加にはギルソンP-100ピペットなど、40μlを正確に量り取れるものをご使用ください。

<10> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器（WTS）を注意深く取り出します。フロースルーを廃棄し、再度廃液容器にカートリッジをセットします。

遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<11> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋を静かにしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器（WTS）を注意深く取り出します。新しい1.5mlマイクロチューブ（非同梱）にカートリッジをセットし、フロースルーと廃液容器を捨てます。

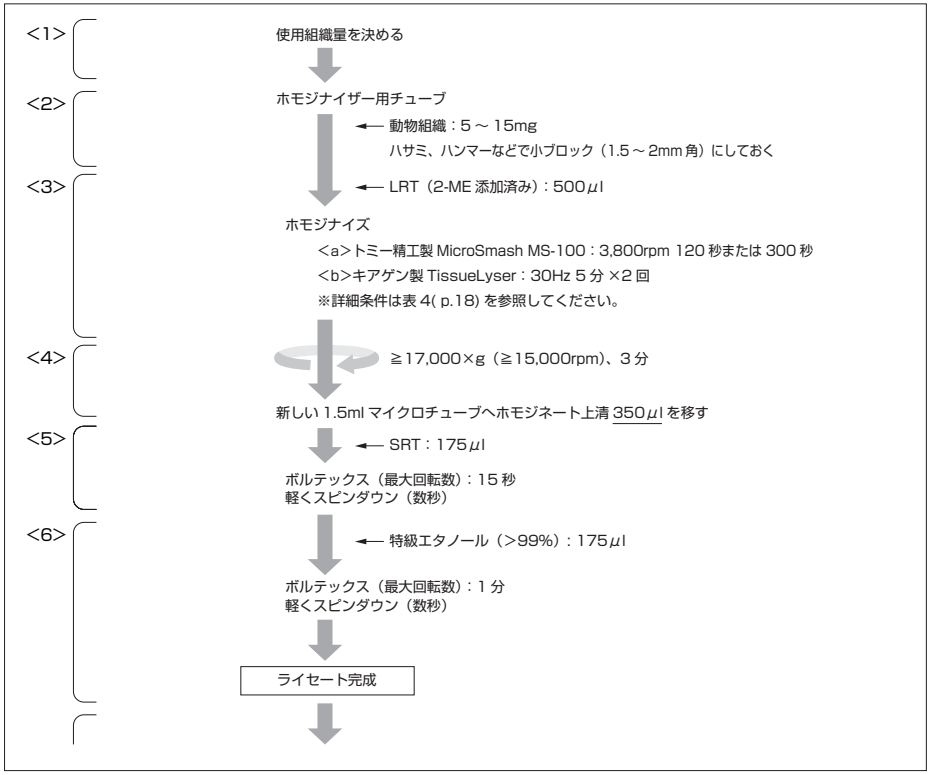
遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

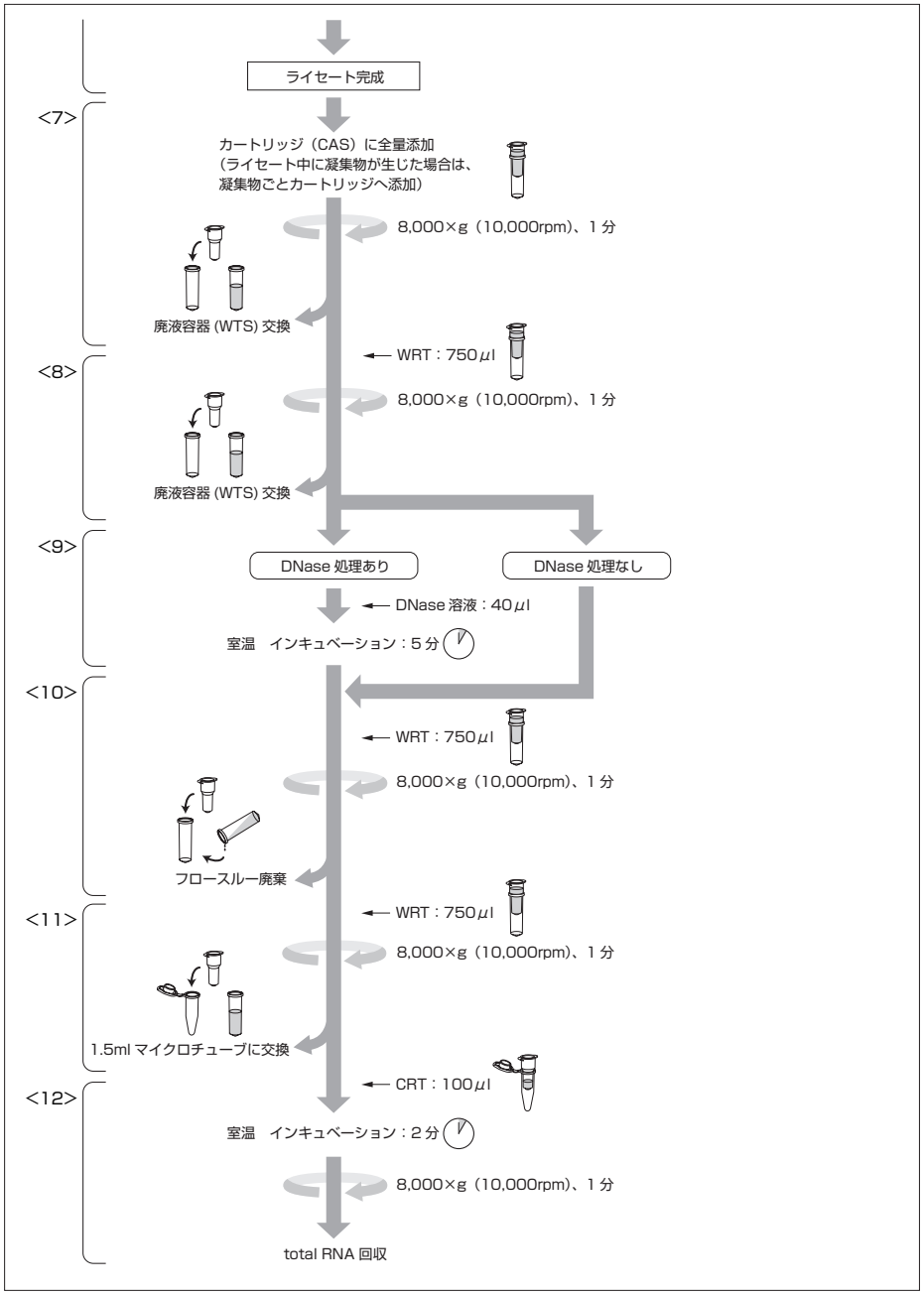
<12> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、CRT 100μlをカートリッジ内のフィルターに直接添加します。室温にて2分間インキュベート後、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心し、溶出します。遠心機からカートリッジと1.5mlマイクロチューブを注意深く取り出し、カートリッジを捨てます。以上でtotal RNA抽出は完了です。

遠心後CRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。
溶出液量は50μlまで下げられますが、その場合、インキュベート時間を4分に延長することをおすすめします（付録1　p.27参照）。すぐにtotal RNAを使用しない場合は、1.5mlマイクロチューブのキャップをしっかりと閉めた後、−20℃または−80℃に保存してください。

組織量5 ～ 15mg：抽出フロー

- LRT使用前に、LRT1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加してください。
- WRTに175mlの特級エタノール（>99%）が添加されていることをご確認ください。
- DNaseを使用する場合はp.4を参照の上、ご用意ください。DNase溶液調製法はp.19に記載されています。





組織量5 ～ 15mg：プロトコール詳細

<1> 動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。
使用する動物組織重量を決めてください。

表1 (p.7) を参考に、スタート組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下する可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らしてご検討ください。表1 (p.7) に載っていない組織種の場合は、スタート組織量は10mgとしてください。

<2> 組織をハサミ、ハンマーなどで1.5 ～ 2mm角の小ブロックにし、動物組織重量を測定します。各ボールミル型ホモジナイザーに対応したチューブ (p.4参照) にあらかじめ5mmφジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時にはRNAの分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT (2-ME添加済み) を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3> LRT (2-ME添加済み) を500μl添加し、ボールミル型ホモジナイザー添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。
回転数や処理時間は、組織の種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は表4のとおりです。3. (p.4) を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

凍結したチューブにLRTを添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないようにご注意ください。

表4 組織量5 ～ 15mgの場合のボールミル型ホモジナイズ条件例

	<a>トミー精工製 MicroSmash MS-100	<b>キアゲン製 TissueLyser
肝臓	3,800rpm 120秒	30Hz 5分×2回
脾臓・心臓	3,800rpm 300秒	

下記の場合はホモジナイズチューブが破損することがありますので、指定の条件を守ってお使いください。

- 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- プロトコールに記載の液量とは異なる液量でホモジナイズを行う場合
- 5mmφジルコニアボール以外のボールを使用する場合

<4> 組織破片を分離除去するため、≧17,000×g (≧15,000rpm) で3分、室温にて遠心します。
底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清350μlを新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。
やむ得ず放置される場合、1時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5> SRTを175μl添加し、最大回転数にてボルテックス15秒間行います。数秒間スピンダウンして、キャップや壁についた液を収集します。

<3> ～ <4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート：SRT：エタノール=2：1：1」に調節してください。

<6> 特級エタノール (>99%) を175μl添加し、最大回転数にてボルテックスを1分間行ってください。数秒間スピンダウンして、キャップや壁についた液を収集します (ライセート完成)。ライセート完成後は、速やかに抽出操作へ進めてください。

このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

<7> ライセートを数回ピペッティングし、注意深くカートリッジ (CAS) の蓋を開け、カートリッジ に全量添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g (10,000rpm) にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器 (WTS、キット同梱) にカートリッジをセットし、フロースルー (ろ液) と廃液容器を捨てます。

試料によっては、凝集物ができることがありますが、すべての凝集物ごとカートリッジ へ添加します。遠心後ライセートがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<8> 注意深くカートリッジ (CAS) の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g (10,000rpm) にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器 (WTS、キット同梱) にカートリッジをセットし、フロースルーと廃液容器を捨てます。

遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<9> DNaseを使用する場合は、チューブラックなどに立てDNase処理へ進めます。
(DNaseを使用しない場合は、<10>に進んでください。)
DNaseは推奨品 (p.4参照) をご準備ください。

<9-1> 各社推奨DNase溶液調製

製品名	メーカー名	Cat.No.	調製方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40μl
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161		
DNase I , RNase-Free	Ambion	2222	2	40U/40μl
RNase-Free DNase Set※1	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40μl

※1：1,500Kunitz unitsの入ったボトルに添付のRNaseフリー水550μl を添加後、DNaseストック溶液を調製してください (DNase添付の取扱説明書も参照してください)。

調製方法1）

1U/μl DNase Ⅰ	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法2）

2U/μl DNase Ⅰ	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法3）

2.7Kunitz units/μl DNase Ⅰ※2	1.25μl
Buffer RDD	35μl
ヌクレアーゼフリー水	3.75μl

※2：QIAGEN社プロトコールどおりにDNase溶液を調製すると、DNase活性が過剰となる可能性があります。上記条件でのDNase溶液調製をおすすめします。

<9-2> DNaseオンカラム処理方法

いずれのDNaseの場合も、カートリッジ（CAS）1本あたりフィルター上に40μl添加します。添加後、室温で5分間カートリッジ上にてインキュベートします。

DNase溶液の添加にはギルソンP-100ピペットなど、40μlを正確に量り取れるものをご使用ください。

<10> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器（WTS）を注意深く取り出します。フロースルーを廃棄し、再度廃液容器にカートリッジをセットします。

遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<11> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、WRT 750μlを添加します。カートリッジの蓋を静かにしっかりと閉め、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器（WTS）を注意深く取り出します。新しい1.5mlマイクロチューブ（非同梱）にカートリッジをセットし、フロースルーと廃液容器を捨てます。

遠心後WRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<12> 注意深くカートリッジ（CAS）の蓋を開け、CRT 100μlをカートリッジ内のフィルターに直接添加します。室温にて2分間インキュベート後、8,000×g（10,000rpm）にて1分間遠心し、溶出します。遠心機からカートリッジと1.5mlマイクロチューブを注意深く取り出し、カートリッジを捨てます。以上でtotal RNA抽出は完了です。

遠心後CRTがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。
溶出液量は50μlまで下げられますが、その場合、インキュベート時間を4分に延長することをおすすめします（付録1　p.27参照）。すぐにtotal RNAを使用しない場合は、1.5mlマイクロチューブのキャップをしっかりと閉めた後、−20℃または−80℃に保存してください。

9. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策をご参照ください。

（1）ホモジナイズチューブが破損した（ボールミル型ホモジナイザーの場合）

原　因	対　策
指定回転数以上で使用した	指定された回転数で使用してください。
ホモジナイズ時の液量が足りない	所定量のLRT（500μl）を添加してください。
指定のボール以外のボールを使った	指定のボール（ジルコニア5mmφ）を1個使ってください。
指定のホモジナイズ用マイクロチューブ以外のチューブを使った	ホモジナイザーに対応したマイクロチューブを使ってください。

（2）RNAの収量が低い、RNAが得られない

原　因	対　策
組織サンプルの保存状態が悪い	組織サンプルの種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でRNA収量は変わります。一度融けたものは使わないでください。
処理組織サンプル量が不適切	表1（p.7）を参照して適切な組織量範囲で抽出してください。
LRT（2-ME添加済み）添加後のホモジナイズが不充分	8-2<3>（p.12、18）に従い、充分ホモジナイズしてください。ボールミルの場合は、ホモジナイザーの設定値、ボール（ジルコニア5mmφ）が入っていることを確認してホモジナイズしてください。
組織量に対応したプロトコールを使っていない	組織量に応じて、15～30mg用プロトコール（p.10）または5～15mg用プロトコール（p.16）を選択してください。
フィルターが破れてしまった	カートリッジ（CAS）内のフィルターにピペットチップが触れないようにご注意ください。
LRTに2-MEが添加されていない	LRTを使用前に必要量分注し、LRT1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加してください。
SRTまたはエタノールを所定量添加していない	SRTまたは特級エタノール（>99%）を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせてSRT、特級エタノール液量を調節してください。
試薬の添加順序が不適切	ホモジネートにSRT添加してボルテックス後、特級エタノール（>99%）を添加してください。
WRTに所定量のエタノールを加えていない	WRT使用前には、必ず所定量の特級エタノール（>99%）を加えたことをご確認ください。（8-1 p.8参照）
カートリッジ（CAS）へライセート全量を添加しきれていない	ライセートに凝集物が見られた場合は、凝集物も含めて全量をカートリッジ（CAS）に添加してください。
DNase溶液を添加し、5分間インキュベーション後、WRTをカートリッジ（CAS）に添加せず遠心した	DNase溶液を添加し、5分間インキュベーション後、WRTを添加し遠心操作を行ってください。
溶出時にインキュベーションしていない	CRTをフィルター上に添加後、2分間インキュベーションしてください。

原　因	対　策
CRT量を50μlにした	CRT量を50μlとする場合は、溶出時のインキュベーション時間を4分間とすることをおすすめします（付録1 p.27参照）。
室温が低すぎまたは高すぎた	指定の室温範囲（15 ～ 28℃）にて操作してください。
遠心操作工程の途中でカートリッジ（CAS）を放置した	遠心操作を始めたら、途中で置かずに最後まで続けてください。
遠心機内の温度が高い	遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。抽出性能に悪影響を及ぼすことがあります。
DNase反応バッファーを所定量添加していない（DNase処理を行う場合）	DNase液を調製時に、所定量のDNase反応バッファーを添加したか、ご確認ください。
DNase液を添加時にフィルターに穴を開けてしまった（DNase処理を行う場合）	フィルターにふれないようにしてDNase液を添加してください。
RNAの分解	（5）「RNAが分解した」参照
RNAの溶出にCRT以外の試薬を使った	RNAの溶出にはCRTを使ってください。

（3）RNAの純度が低い

原　因	対　策
所定の洗浄条件で行っていない	洗浄はWRT 750μlで3回行ってください。
カートリッジ（CAS）へのライセート添加時に泡が立った	添加時に泡を入れると泡が最後まで残り、コンタミの原因になります。添加時に泡を入れないようご注意ください。
WRTに所定量のエタノールを加えていない	WRT使用前には、必ず所定量の特級エタノール（>99%）を加えたことをご確認ください。（8-1 p.8参照）
RNAの溶出にCRT以外の試薬を使った	RNAの溶出にはCRTを使ってください。
遠心機の回転数が不適切	カートリッジ（CAS）遠心の際は、8,000×g（10,000rpm）で遠心してください。
遠心後のフロースルーがカートリッジ(CAS)に付着した	遠心後、遠心機からカートリッジ（CAS）と廃液容器（WTS）を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は軽くスピンダウン（数秒）を行って取り除いてください。

（4）カートリッジ（CAS）が詰まった

原　因	対　策
組織量に対応したプロトコールを使っていない	組織量に応じて、15 ～ 30mg用プロトコール（p.10）または5 ～ 15mg用プロトコール（p.16）を選択してください。 目詰まりしやすい組織の場合は、15 ～ 30mg用プロトコール（p.10）をお試しください。 本キットで初めて抽出する組織の場合は、10mgから試してください。
処理組織サンプル量が多すぎる	表1（p.7）を参照して、処理量を下げてください。 例）肝臓30mgのサイズ 上 横

原　因	対　策
LRT（2-ME添加済み）添加後のホモジナイズが不充分	8-2<3>（p.12、18）に従い、充分ホモジナイズしてください。または、ホモジナイズ時間を延長してください。ボールミルの場合、ホモジナイザーの設定値、ボール（ジルコニア5mmφ）が入っていることを確認してホモジナイズしてください。 例）肝臓ホモジナイズ後の状態例
ホモジナイズ後遠心を行い、上清を分取する際に、上清と一緒に残渣をとってしまった	遠心操作を繰り返すか、遠心時間を延長して、残渣を確実に取り除いてください。
遠心機の回転数が不適切	カートリッジ（CAS）遠心の際は、8,000×g（10,000rpm）で遠心してください。
カートリッジ（CAS）遠心時間が不充分	遠心時間を延長してください。
SRTまたはエタノールを所定量添加していない	SRTまたは特級エタノール（>99%）を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせてSRT、特級エタノール液量を調節してください。
WRTに所定量のエタノールを加えていない	WRT使用前には、必ず所定量の特級エタノール（>99%）を加えたことをご確認ください。（8-1 p.8参照）
室温が低すぎまたは高すぎた	指定の室温範囲（15 ～ 28℃）にて操作してください。
遠心機内の温度が高い	遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。
推奨ではないDNaseを使用した	3.（p.4）を参照して、推奨のDNaseをご使用ください。
遠心時間を延長してもライセートや洗浄液が抜けきらない	「補足（p.25）」を参考に、カートリッジ（CAS）からフィルターを取り外して、核酸のリカバリーを試してください。

（5）RNAが分解した

原　因	対　策
組織の保存方法が不適切	組織をすぐに用いない場合は、液体窒素で急速に凍結後、−80℃にて保存してください。一度融けた組織は使わないでください。
LRTに2-MEが添加されていない	LRTを使用前に必要量分注し、LRT1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加してください。
RNaseのコンタミネーション	すべての試薬、カートリッジ（CAS）がRNaseフリーであることは確認済みですが、操作中・保存中にRNaseが混入する可能性があります。 RNaseの混入がないようにご注意ください。
DNaseへのRNaseの混入（DNase処理を行う場合）	推奨しているRNase-Free DNaseを使用してください。
RNAの加温処理	RNAは加温すると分解することがあります。 RNA使用中もできるだけ氷上に保管してください。

(6) RT-PCRなど、続けて行う実験がうまくいかない

原　因	対　策
使用したRNA量が不適切	260nm吸光度から濃度をご確認ください。
ゲノムDNAの混入	DNase処理してください。
RNAの分解	(5)「RNAが分解した」参照
所定の洗浄条件で行っていない	洗浄はWRT 750μlで3回行ってください。

(7) DNAの分解が不完全 (DNase処理ありの場合)

原　因	対　策
推奨ではないDNaseを使用した	3. (p.4) を参照して、推奨のDNaseをご使用ください。
フィルターがDNase溶液に浸りきっていない	DNase溶液添加時に、DNaseがカートリッジ (CAS) 中のフィルター全体に行き渡っているかご確認ください。
DNase活性量が不充分	推奨のDNase活性量をご使用ください。
DNase処理時間が不充分	室温 (15 ～ 28℃) で5分インキュベーションしてください。
DNaseを所定量添加していない	DNase液を調製時に、所定量のDNaseを添加したか、ご確認ください。

(8) 試薬に析出物が生じた

原　因	対　策
低温で保存している	指定の温度 (15 ～ 28℃) で保存してください。 析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

(9) 廃液容器 (WTS) が破損した

原　因	対　策
指定の条件 (8,000×g) 以上で遠心機を使用した	指定の条件 (8,000×g) で遠心機を使用してください。

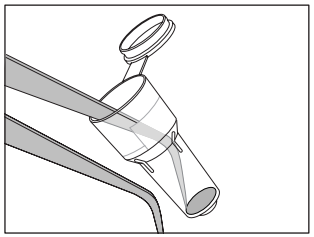
補足：目詰まりしたカートリッジ (CAS) からの核酸リカバリー方法

a) ライセート遠心工程で目詰まりした場合
カートリッジ (CAS) に残ったライセートを新しいカートリッジ (CAS) に移し、8-2<7>以降 (p.13またはp.19) の操作を再度行ってください。
目詰まりしたカートリッジ (CAS) のフィルターからのリカバリーは下記1) 以降を参照してください。

b) 洗浄遠心工程で目詰まりした場合
カートリッジ (CAS) に残った洗浄液を捨ててください。
目詰まりしたカートリッジ (CAS) のフィルターからのリカバリーは下記1) 以降を参照してください。

【目詰まりしたカートリッジ (CAS) からの核酸リカバリー方法】
1) あらかじめ、1.5mlマイクロチューブに350μl LRT (2-ME添加済み) を分取しておきます。
2) 先曲り先細ピンセットまたは耳鼻科用ピンセットを準備します。
ピンセット先をバーナーで炙るか、RNase除去剤で拭くなどして、RNaseコンタミにはお気をつけください。
3) 図2、3を参考に、ピンセットの先でフィルターの外周を押さえつけながら、フィルターをカートリッジ (CAS) より外してください。
4) 取り外したフィルターを1) で準備した1.5mlマイクロチューブ中のLRT (2-ME添加済み) に浸漬し、10分間室温にてインキュベーションします。
5) 最大回転数にてボルテックスを1分間行ってください。数秒間スピンダウンして、キャップや壁についた液を収集します。
6) フィルターを取り出し、他のチューブに入れます (リカバリー完了後、廃棄します)。
7) 8-2<5> (p.19) 以降へ進み、組織量5 ～ 15mgからtotal RNAを抽出する方法にてtotal RNAを回収してください。

図2　ピンセットをカートリッジ (CAS) に入れた様子


先曲り先細ピンセットの場合

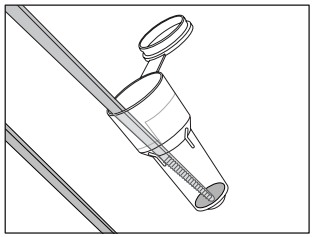
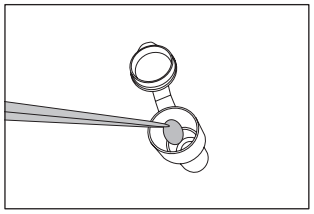

耳鼻科用ピンセットの場合

図3　フィルターを取り外したところ

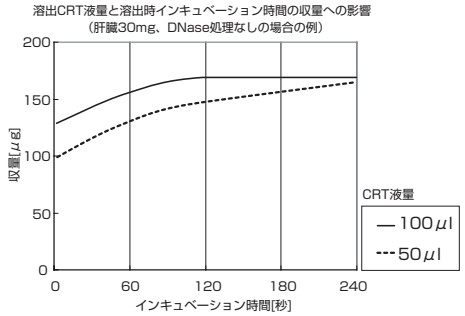


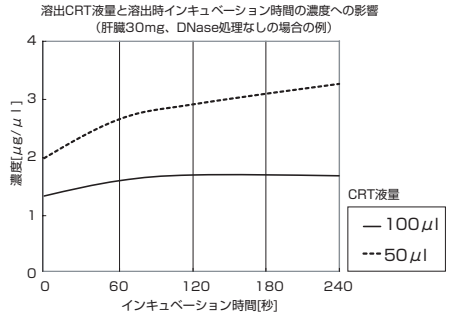
10. オーダリング・インフォメーション

製　品	Cat #
QuickGene SP kit DNA tissue	SP-DT
DNA組織キット(スピン法)	
QuickGene SP kit DNA whole blood	SP-DB
DNA全血キット(スピン法)	
QuickGene SP kit RNA tissue	SP-RT
RNA組織キット(スピン法)	
QuickGene SP Kit RNA cultured cell	SP-RC
RNA培養細胞キット(スピン法)	
QuickGene SP Kit RNA cultured cell HC	SP-RC2
RNA培養細胞HCキット(スピン法)	
QuickGene SP kit Plasmid	SP-PL
プラスミドキット(スピン法)	

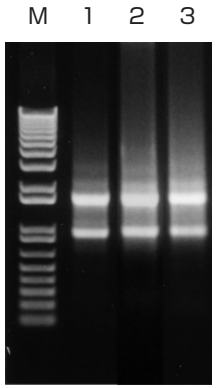
付録1　QuickGene SP kit RNA tissue（SP-RT）データ例

● 溶出CRT液量・溶出時インキュベーション時間と収量・濃度の関係





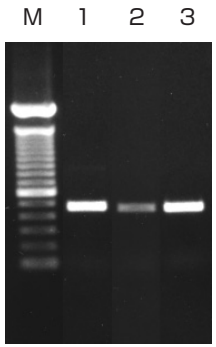
● 電気泳動結果



M：1Kb Plus DNA Ladder（Invitrogen）
1 ：肝臓（DNase処理あり）
2 ：脾臓（DNase処理あり）
3 ：心臓（DNase処理あり）

泳動条件：1%アガロースゲル/1×TAE

● RT-PCR結果



M：100bp DNA Ladder（Invitrogen）
1 ：肝臓（DNase処理あり）
2 ：脾臓（DNase処理あり）
3 ：心臓（DNase処理あり）

テンプレート：10pg/μl total RNA相当量のcDNA
プライマー　：G3PDH
泳動条件　　：1%アガロースゲル/1×TAE

＊トレードマークと免責事項
本取扱説明書に使用されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。

FUJIFILM

● 製造・販売元

富士写真フイルム株式会社

● 製品に関するお問い合わせ

東京本社
ライフサイエンス事業部
〒 106-8620 東京都港区西麻布 2-26-30
TEL 03-3406-2201　FAX 03-3406-2158
e-mail: sginfo@fujifilm.co.jp

[URL] http://lifescience.fujifilm.com/

FPT-608106-FP-1